Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
Würzburg
Direktor: Professor Dr.med. Kurt Kochsiek

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNG VON SUBSTANZ P AUF DAS cAMP-SYSTEM IN DEFINIERTEN AREALEN DES ZENTRALNERVENSYSTEMS

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Dieter Schweickert
aus Forchheim

Würzburg, den 16. November 1981

1982

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
Würzburg

Direktor: Professor Dr.med. Kurt Kochsiek

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNG VON SUBSTANZ P AUF DAS cAMP-SYSTEM IN DEFINIERTEN AREALEN DES ZENTRALNERVENSYSTEMS

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Dieter Schweickert
aus Forchheim

Würzburg, den 16. November 1981

Referent:	Priv.Doz. Dr.med. Gerhard Schmid
Korreferent:	Professor Dr.med. Kurt Kochsiek
Dekan:	Professor Dr.med. K.-A. Bushe

Tag der mündlichen Prüfung: 1.7.1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg

Meinen Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543526_0034

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	1
1. Geschichtliches	1
2. Pharmakologische Aspekte	2
3. Physiologische Aspekte	2
4. Substanz P und das cAMP-System	3
5. Problemstellung	5
B. MATERIAL UND METHODEN	6
1. Versuchstiere und Tierhaltung	6
2. Herstellung des Katheters	6
3. Operatives Vorgehen	6
4. Ablauf der Ventrikelinjektion	14
5. Bestrahlung der Tiere	14
6. Gewinnung der Areale	16
7. Biochemische Analytik	16
7.1. Extraktion und Reinigung	16
7.2. Radioimmunologische Messung von cAMP	18
7.3. Proteinbestimmung	19
8. Statistik	20
9. Vorversuche	20
9.1. Herstellung des Katheters	20
9.2. Operatives Vorgehen	21
9.3. Ablauf der RR-Kontrolle	27
C. ERGEBNISSE	32
D. DISKUSSION	37
E. ZUSAMMENFASSUNG	41
LITERATURVERZEICHNIS	I - VI

A. EINLEITUNG

1. Geschichtliches

Bei Untersuchungen über die Gewebsverteilung von Acetylcholin in verschiedenen Geweben entdeckten VON EULER und GADDUM im Jahre 1931 im Gehirn und Dünndarm von Pferden eine neue Substanz, die sie als Präparation P (Powder) bezeichneten. Diese Substanz erhöhte die Kontraktilität am glatten Darmmuskel. Bei weiteren Versuchen an Kaninchen bewirkte sie bei intravenöser Gabe eine Vasodilatation und daraus eine kurzfristige Blutdrucksenkung. GADDUM und SCHILD nannten diese neue Substanz, die in ihren biologischen Wirkungen und chemischen Eigenschaften keiner anderen bisher bekannten Substanz entsprach, Substanz P. Dieser neue Faktor wurde 1936 von VON EULER als proteinähnlicher Wirkstoff erkannt.

LEEMAN und HAMMERSCHLAG fanden 1967 Peptide mit speichelfördernder Wirkung in Extrakten von Ochsen- und Rattenhypothalami. LEMBECK und STARKE entdeckten 1968, daß diese Wirkung der Substanz P zugeschrieben werden konnte. CHANG und LEEMAN stellten 1970 die Substanz P als Undecapeptid dar. Die Sequenz des Peptids fanden CHANG und Mitarbeiter 1971 heraus:

Arg-Pro-Lys-Pro-Glu-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-MetNH_2

Diese synthetische Substanz P wurde 1971 von TREGEAR und Mitarbeiter über die gefundene Sequenzreihe hergestellt. Bei Vergleichsversuchen besaß sie die gleichen physikalischen, chemischen und biologischen Auswirkungen wie der natürlich vorkommende Stoff. Die Versuche von STUDER (1973) ermöglichten die Behauptung, daß die speichelsekretionsaktive Substanz P identisch mit der klassischen "Präparation P" ist, die von VON EULER und GADDUM gefunden wurde.

2. Pharmakologische Aspekte

Die Wirkungen des pharmakologischen Undecapeptids sind mannigfach. Substanz P besitzt eine stimulatorische Wirkung auf die Speichelsekretion (CHANG, LEEMAN 1970), erhöht in der Niere die Na^+-Sekretion (MILLS et al. 1974), bewirkt über Vasodilatation eine kurzfristige Blutdrucksenkung (VON EULER, GADDUM 1931) und steigert die Kontraktilität an der Darmmuskulatur (VON EULER, GADDUM 1931; PERNOW 1953).

Besonders vielfältig sind die Wirkungsmechanismen von Substanz P im Nervensystem. Sie erhöht die Glycinkonzentration im Gehirn (STERN et al. 1974), steigert die Wirkung von LSD-erzeugtem Tremor (STERN 1973) und wirkt als Antagonist zu Morphinanalgetika über eine depressorische Wirkung auf die Renshawzellen (BELCHER, RYALL 1977). Auch fungiert Substanz P als Transmitter bei sensiblen Nerven (OTSUKA, KONISHI 1976), möglicherweise auch in Beziehung mit der Schmerzübertragung (HENRY 1976; RANDIC, MILETIC 1977). Bei Motoneuronen induziert Substanz P eine Depolarisation (OTSUKA et al. 1972).

3. Physiologische Aspekte

Die physiologische Funktion von Substanz P ist noch unbekannt. Da das Peptid in hoher Konzentration besonders im Gehirn vorkommt, wird eine Bedeutung als Neurotransmitter (LEEMAN, MROZ 1974; LEMBECK, ZETLER 1968; OTSUKA, KONISHI 1976) oder als Modulator der synaptischen Übertragung diskutiert (ALBANO et al. 1973). Darauf würde auch die unterschiedliche Verteilung und verschieden große Konzentration (HOKFELT et al. 1975) hinweisen, die über Bioassay- und Radioimmunoassaymethoden (DUFFY et al. 1975) festgestellt wurden.

4. Substanz P und das cAMP-System

Seit den Arbeiten von SUTHERLAND und Mitarbeitern ist bekannt, daß Adenosin 3'5'Monophosphat als "Second Messenger" verschiedener Hormone fungiert. Abbildung 1 zeigt schematisch die Vorstellungen über die durch cAMP vermittelten Hormonwirkungen. Cyclo-AMP wird von der in der Zellmembran gebundenen Adenylcyclase aus ATP gebildet und stellt somit das erste Glied in einer Kette von intrazellulären biochemischen Reaktionen dar. Es spielt u.a. sowohl für die Permeabilitätsänderungen der Zellmembran als auch direkt in der Kontrolle des biochemischen Funktionsablaufs eine zentrale Rolle. Entsprechend dieser Funktionskette wurden wiederholt auch Übereinstimmungen in der Verteilung von Neurotransmittern und neurotransmittersensitiver Adenylcyclase beschrieben (BROWN, MAKMAN 1973; DRUMMOND, MA 1973; GREENGARD 1975; KEBABIAN et al. 1975).

Die Stimulierbarkeit der Adenylcyclaseaktivität und der cAMP-Bildung im Gehirn von Ratte und Mensch durch Substanz P (DUFFY, POWELL 1975) läßt einen Zusammenhang zwischen Substanz P und cAMP erkennen. Das ähnliche Verteilungsmuster von Substanz P und von Substanz P-stimulierter Adenylcyclase (DUFFY et al. 1975) in verschiedenen Gehirnarealen spricht für die Möglichkeit einer biologischen Bedeutung (KATAOKA 1962). Eine Informationsweitergabe von Substanz P über die Adenylcyclase in das Perikaryon erscheint somit sehr wahrscheinlich.

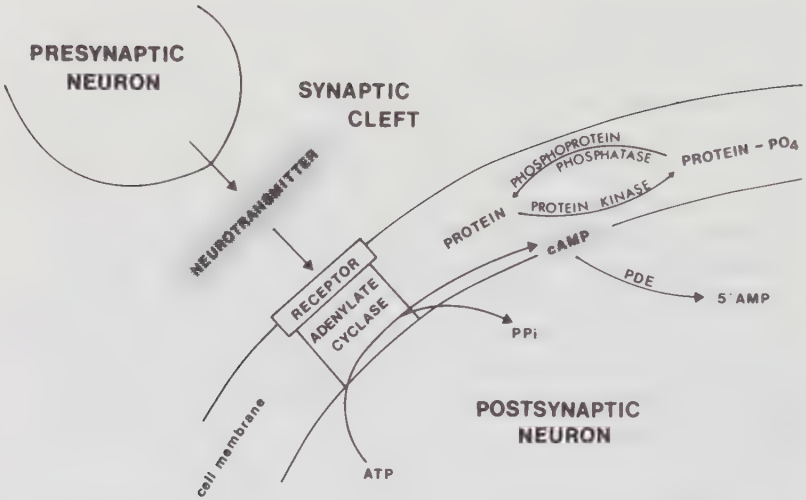


Abbildung 1: Basale Komponenten der cAMP-vermittelten Reaktion bei der Neurotransmission (nach GREENGARD 1975; NATHANSON 1977)

5. Problemstellung

Die folgende Versuchsreihe wurde unternommen, um die Wirkung von Substanz P auf das cAMP-System in verschiedenen Gehirnarealen zu untersuchen. Bei normotensiven Ratten, die im Augenblick der Applikation bei Bewußtsein waren, wurde synthetische Substanz P in das Liquorsystem des Seitenventrikels gegeben und die cAMP-Konzentrationen in definierten kleinen Hirnarealen gemessen. Daraus sollte sich die topographische Beschreibung der Substanz P-Wirkung in verschiedenen Hirnabschnitten ergeben, soweit das cAMP-System einbezogen ist.

Die Substanz P-Dosis wurde nach Vorversuchen so niedrig gewählt, daß Kreislaufparameter nicht verändert wurden.

B. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchstiere und Tierhaltung

Für die Versuche wurden männliche Wistarratten mit einem Gewicht von 180 - 200 g und einem Alter von 14 - 16 Wochen genommen. Die Tiere wurden unter Standardbedingungen gehalten, mit einer Käfigtemperatur von 20°C und unter Beleuchtung von 6^{00} - 18^{00} Uhr. Den Ratten wurde als Standarddiät Altromin^{R} und unbegrenzt Wasser gegeben.

2. Herstellung des Katheters

Der Katheter wurde selbst angefertigt. An dem Katheterschlauch, PE 20, wurde durch Erhitzen mit heißer Stickstoffluft, die beim Durchströmen eines Kupferrohrsystems erwärmt wurde, ein Knoten gebildet, der vom Katheterende 5 mm entfernt war und als Stop beim Hineinschieben diente. Um das Lumen des Schlauches beim Erhitzen nicht zu verschließen, wurde zuvor ein dünner Metalldraht in das Lumen eingedreht. Der Knoten diente als Schutz des Ventrikels vor einer Totalperforation und als Schutz des Gehirns vor Verletzungen. Falls sich der Katheter beim Hineinschieben noch etwas anhob, mußte er noch 1/2 mm gekürzt werden. Die Katheterlänge war so bemessen, daß das Leervolumen 2 µl betrug.

3. Operatives Vorgehen

Vor dem operativen Eingriff wurden die Tiere mit Na^{+}-Evipan (0,18 ml/100 g Lebendgewicht) subcutan anästhesiert.
Für die Katheterisierung wurde die Kopfhaut der Tiere mit einem Skalpell aufgeschnitten. Der Schnitt begann zwischen den Augen und führte 3 - 3,5 cm in Richtung Hinterkopf.

Das Skalpell diente auch zum Abschaben des Periosts, um die Kalottenstrukturen vollständig freizulegen. Der Kopf der Ratte wurde in einen stereotaktischen Tisch eingespannt. Der Fixierstab mit dem Katheter wurde auf den anterioren Suturenschnittpunkt eingestellt und daraufhin 1,5 - 2 mm nach rechts und 0,5 mm nach ventral geschwenkt. Dieser Punkt wurde mit einem Filzstift markiert und diente als Bohrpunkt für den Ventrikelkatheter. In der gleichen Entfernung zur Suturenmitte wurde in dorsaler Richtung, in einer Distanz von 20 - 25 mm zum ersten Bohrpunkt, ein zweiter markiert (Abb. 2).

Mit einem Rosenbohrer Größe 0, der in einer Zahntechnikermaschine eingespannt war (Abb. 3), wurde die Schädelkalotte an diesen Markierungen durchbohrt. Die Eindringtiefe des Bohrers konnte am Bohrerkopf so eingestellt werden, daß das Gehirn geschont werden konnte (Abb. 4). In die ventrale Bohrung wurde der PE-10-Katheter eingeschoben (Abb. 5). In die zweite Bohrung wurde eine Schraube 1 - 1,5 mm eingedreht (Abb. 6). Sie sollte so fest eingeschraubt sein, daß man die Ratte daran hochziehen konnte. Zum Fixieren des Katheters an die Schraube diente das Kaltpolymerisat PALAVIT 55 (Kulzer, Bad Homburg) (Abb. 7). Bei dem Aufbringen des Kunststoffes wurde den Tieren zum Schutz ihrer Augen der Kopf mit Zellstoff abgedeckt. Nach dem Ausformen und Aushärten des Kunststoffes wurden die Tiere bis zum Versuch, der einige Tage später stattfand, in Einzelkäfigen gehalten.

Abbildung 2: Markierung der Bohrpunkte

Abbildung 3: Ansetzen der Bohrmaschine

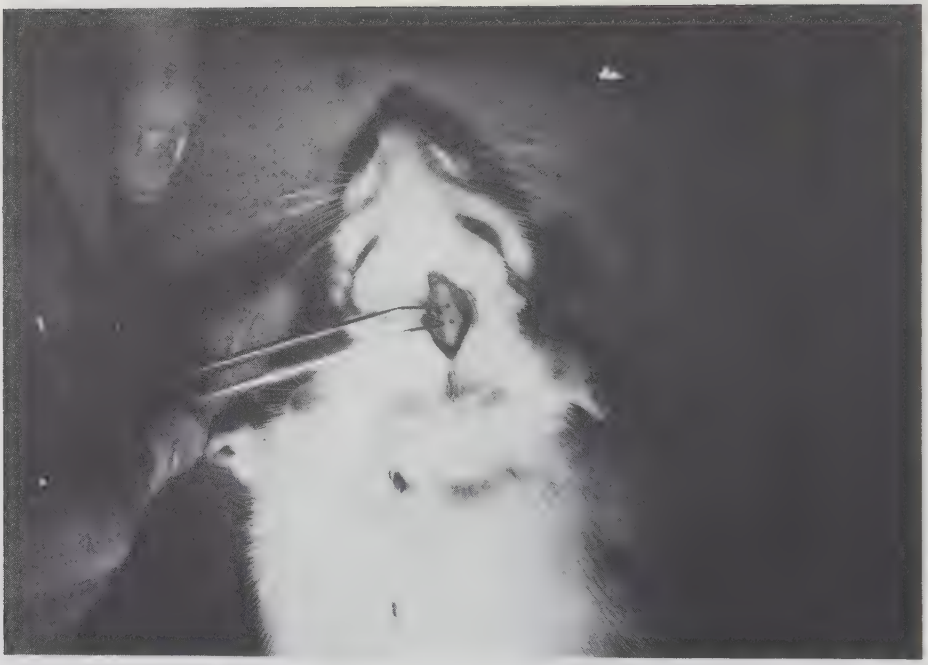


Abbildung 4: Ventrale und dorsale Bohrung

Abbildung 5: Der Katheter in der Bohrung

Abbildung 6: Die Schraube in der Bohrung

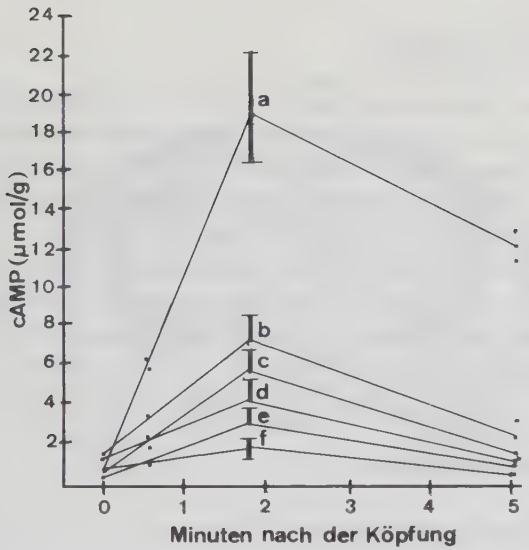
Abbildung 7: Kunststoffabdeckung und Fixierung des Katheters an die Schraube

4. Ablauf der Ventrikelinjektion

Die Applikation in den Ventrikelkatheter erfolgte mittels einer 10 µl Hamiltonspritze (Hamilton Bonadux AG CH 7402 Bonadux Suisse PO Box 26). Die Injektionsmenge betrug 5 µl; zu dieser Menge mußte dann noch das Leervolumen des Katheters von 2 µl addiert werden. Es wurde synthetische Substanz P (Sigma, München) benutzt, die mit 0,9 % NaCl-Lösung im Verhältnis 300 µg Substanz P auf 100 µl Lösung verdünnt wurde. Den Kontrolltieren, denen 0,9 % NaCl appliziert wurde, wurde die gleiche Menge injiziert, um Hirndruckveränderungen auszuschalten. Den Ratten wurde die Applikation bei Bewußtsein gegeben; sie mußte vorsichtig und langsam vorgenommen werden, um den Tieren unnötige Belastungen zu ersparen. Auch lagen zwischen Op-Eingriff, Anreise und dem Versuchstermin zwei Tage, um die Ratten nicht mit unnötigem Streß zu belasten, der den Versuchsablauf beeinflussen könnte.

5. Bestrahlung der Tiere

Die Firma Schering (Berlin) stellte für die Tötung der Tiere ihren Mikrowellenherd zur Verfügung. Nach der Injektion der Substanz P-Lösung wurden die Ratten nach 15 Minuten durch Bestrahlung mit focusierten Mikrowellen unter Verwendung einer Mikrowellen-Erwärmungsanlage (Fa. Püschner, Schwanewede Typ 541225-138601-1; übertragbare UHF-Leistung 8 kW) getötet. Die verwendete Anlage war so gewählt, daß die Ratten - streßfrei - die Bestrahlungsröhre durchlaufen konnten. Bei eingeschaltetem Gerät passierten sie dabei eine Lichtschranke, wobei die auf den Rattenkopf gerichtete focusierte Mikrowellenbestrahlung ausgelöst wurde. Die Tötung durch Gehirnfixation erfolgte nach 0,8", bedingt durch die Temperaturerhöhung des Gehirns auf 85°C. In den auf diese



a cerebellum
b truncus cerebri
c hypothalamus
d mesencephalon
e hippocampus
f cortex

Abbildung 8: Postmortale Veränderungen der cAMP-Werte in verschiedenen Hirnarealen (SCHMIDT M.J. et al. 1971)

Weise fixierten Gehirnen ließen sich weder Adenylcyclase- noch Phosphodiesterase-Aktivitäten (SCHMID 1979) nachweisen. Cyclisches AMP blieb als hitzestabiles Molekül intakt. Abbildung 8 zeigt postmortale Veränderungen von cAMP in verschiedenen Gehirnarealen (nach SCHMIDT et al. 1971).

6. Gewinnung der Areale

Es wurden von den entnommenen Gehirnen im Cryostaten in frontaler Ebene Serienschnitte mit 300 µm Durchmesser gewonnen. In Zusammenarbeit mit Professor Palkowitz wurden nach dem von ihm zum erstenmal beschriebenen Verfahren (PALKOWITZ 1973) unter dem Mikroskop mit Stanzen unterschiedlicher Größe (0,3 - 1,5 mm Durchmesser) die betreffenden Gehirnareale ausgestanzt. Ausgestanzte Arealgebiete sind in der Abbildung 9 in einem sagittalen Gehirnschnitt dargestellt.

7. Biochemische Analytik

7.1. Extraktion und Reinigung

Extraktion und Reinigung erfolgten nach der von SCHMID (1979) im Detail beschriebenen Methode.
Die einzelnen Gehirnproben wurden zunächst in kleinen Plastikhütchen aufbewahrt und tiefgefroren. Zur Weiterverarbeitung wurde die Probe in Glasröhrchen (Fassungsvermögen ca. 400 µl) unter Beigabe von 110 µl 1N $HClO_4$ homogenisiert. Das Homogenat wurde für 15 Minuten bei $4^{o}C$ bei 3000 U/min zentrifugiert, um das cAMP vom Protein zu trennen. Das Protein setzt sich am Boden ab, während sich das cAMP im Überstand hält.
100 µl dieses Überstandes wurden in Sarstedt-Hütchen (Fassungsvermögen 0,75 ml) aufgetragen, die folgendermaßen vorbereitet waren:

Abbildung 9: Lage der ausgestanzten Hirnareale in einem sagittalen Schnitt eines Rattengehirns

Die Hütchen wurden mit 15 - 20 µl gereinigter, d.h. mit 1N $HClO_4$ vorgewaschener Al_2O_3 gefüllt, und es wurden 300 µl 1N $HClO_4$ hinzugegeben. Im Heidolph-Schüttler wurden die Hütchen nochmals durchgewaschen (15 min), der Überstand wurde abgesaugt und 100 µl des Überstands der Probe aufgetragen. Wieder wurden die Proben 15 min geschüttelt. Dieser Schüttelvorgang wiederholte sich zwischen jeder der kommenden Phasen.
Das cAMP band sich nun an das Al_2O_3. Nach dem Schüttelvorgang wurde der Überstand abgesaugt und nochmals 150 µl 1N $HClO_4$ aufgetragen, um die Bindung des cAMP an das Al_2O_3 zu verstärken und um andere Substanzen, die die Bestimmung stören könnten, herauszuwaschen.
Um das cAMP im Radioimmunoassay (RIA) bestimmen zu können, muß es sich in einem Puffer mit einem pH von 6,2 befinden. Deshalb waren die nächsten 2 Reinigungsphasen Übergangsphasen, um vom sauren Milieu der $HClO_4$ in höhere pH-Bereiche zu kommen.
Nach Absaugen der $HClO_4$ wurde also 100 µl Ampuwa auf die Probe aufgetragen. Diese Phase wurde nach dem Schüttelvorgang und Absaugen wiederholt. Der pH befand sich nun bei ca. 5,0. Das cAMP begann sich von dem Al_2O_3 erst bei einem pH von 6,0 zu lösen. In der nächsten Phase wurde also 120 µl Na-acetat Puffer pH 6,2 0,2 M aufgetragen. Das cAMP löste sich und befand sich nun im Überstand. Nach dem Schüttelvorgang wurden die Proben kurz anzentrifugiert und 100 µl vom Überstand wurde in Röhrchen gesammelt. Nochmals wurde 100 µl Puffer aufgetragen und gesammelt.
Zur endgültigen Lösung des cAMP vom Al_2O_3 wurden 200 µl 1N NaOH 0,002 M aufgetragen und in Röhrchen gesammelt. Diese gesammelten 400 µl Eluat konnten nun im kommerziellen RIA von Schwarz/Mann bestimmt werden.

7.2. Radioimmunologische Messung von cAMP

Der Schwarz/Mann Radioimmunoassay Kit für cAMP beruht auf den Grundprinzipien der Reaktion eines Antigens mit seinem spezifischen Antikörper. Als limitierender Faktor wird der

Antikörper (100 µl) mit der Probe gemischt (= 400 µl Eluat), die das zu bestimmende Antigen und eine bekannte Menge an radioaktivem Antigen (100 µl) enthält. Während einer angemessenen Inkubationszeit (20 Std.) bildet sich ein Gleichgewicht zwischen markiertem Antigen - Antikörper - Komplex und unmarkiertem Antigen - Antikörper - Komplex. Endogenes und markiertes Antigen konkurrieren mit denselben aktiven Bindungsstellen an dem Antikörper, und als Ergebnis ist die Menge an gebildetem markierten Komplex umgekehrt proportional zur unmarkierten Antigenkonzentration.
Die Konzentration eines Antigens in einer unbekannten Probe wird bestimmt durch Vergleich mit einer Standardkurve, die dargestellt wird, indem verschiedene bekannte Mengen des Antigens mit der gleichen begrenzten Menge Antikörper und einer konstanten Konzentration von markiertem Antigen reagieren.

Der Antikörper im Schwarz/Mann RIA Kit wurde bei Kaninchen gegen eine Succinyl-cAMP-Albumin-Verbindung gewonnen und ist spezifisch für cAMP. Das markierte Antigen ist ein cAMP-Derivat, nämlich Succinyl-cAMP-Tyrosin-Methyl-Ester (^{125}J).

Die Trennung des an den Antikörper gebundenen Antigens vom freien Antigen erreicht man durch Ausfällung des Antigen - Antikörper - Komplexes mit Ammoniumsulfat (2,5 ml/Probe). Nach Zentrifugierung und Dekantierung bestimmt man die gebundene Radioaktivität im Rückstand (den markierten Antigen - Antikörper - Komplex) durch Messen in einem Festkristall-szintillationsmeßgerät.

7.3. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgt nach der Methode von LOWRY und Mitarbeiter (1951). Zu dem Proteinrückstand nach dem Zentrifugieren des Homogenats gibt man 200 µl 1 % SDS (in 1N NaOH gelöst). Nachdem sich das Protein gelöst hat, werden 150 µl abgenommen und mit 400 µl zweifach destilliertem Wasser (Bidest) verdünnt. Die so vorbereitete Probe

wird im Autoanalyzer bestimmt.

Der Proteingehalt der Proben muß deshalb bestimmt werden, weil das genaue Gewicht der einzelnen Gehirnprobe unbekannt ist. Daher benötigt man den Proteingehalt als Bezugsfaktor zum cAMP-Gehalt.

8. Statistik

Zur statistischen Prüfung der vorliegenden Untersuchungsergebnisse wurde unter Berücksichtigung der Fragestellung der einfache t-Test herangezogen. Angegeben sind, soweit nicht anders vermerkt, die Mittelwerte ± Standardabweichung.

9. Vorversuche

Substanz P besitzt, wie einleitend beschrieben, zentrale Effekte, vor allem auf den Blutdruck. Um eine Überlagerung auf das cAMP-System auszuschließen, wurde eine Vorversuchsreihe mit unterschiedlicher Substanz P - Dosis und BR - Messung durchgeführt, um die Dosis zu ermitteln, die keine Veränderungen der cardiovaskulären Parameter bringt.

9.1. Herstellung des Katheters

Die Katheter wurden selbst gefertigt. Zwei Kunststoffschläuche, PE 10 und PE 20, wurden unter heißer Stickstoffluft, die bei dem Durchlaufen eines Kupferrohrsystems von einem Bunsenbrenner erwärmt wurde, zusammengeschweißt. Um das Lumen der Schläuche nicht zu verschließen, wurde zuvor ein dünner Metalldraht in die Schläuche eingedreht. Während des Zusammenschweißens mußten zwei Knoten an der Nahtstelle hergestellt werden, zwischen denen ein Faden

verknotet wurde, um den Katheter im Körper zu fixieren. In einem heißen Wasserbad wurde dann noch der dickere Katheteranteil zweimal um ein kleines Rohr gedreht. Diese zwei Schlaufen dienten zum Ausgleich der Bewegungen der Tiere.

9.2. Operatives Vorgehen

Vor der Operation wurde den Tieren auf dem Schädel und auf der Brust das Fell abrasiert. Daraufhin wurde die auf dem Rücken liegende Ratte auf dem Operationstisch fixiert. Nachdem mit Schere und Zupfpinzette die äußere Haut aufpräpariert war, wurden die Faszien und der Thymus nach lateral gezogen, so daß der Musculus sternohyoideus zu sehen war. Dieser wurde mit einer Spreizpinzette längs gespalten, die Trachea freigelegt, lateral der Trachea die Arteria carotis mit einer Pinzette untergriffen und aus dem Brustraum herausgezogen. Nach der sorgfältigen Trennung vom Nervus vagus wurde die Arterie mit einem Op-Faden cranial fest abgebunden und caudal mit einer Schleife lose fixiert. Nach der Prüfung der Dichtigkeit des Katheters mittels Durchspülen mit NaCl wurde er auf einem Perforator fixiert. Diese Nadel mußte lateral der Arteria carotis intracorporal durch das Rückengewebe gestoßen werden (Abb. 10), bis der Knoten des Katheters fest am Rückeninneren anlag. Hierbei mußte darauf geachtet werden, daß die Schleife sauber lateral der Arterie lag (Abb. 11) und den Nervus vagus nicht komprimierte. Der Katheter wurde sofort an eine NaCl-Spritze angeschlossen und durchspült. Daraufhin mußte die Arterie mit einer Spreizpinzette nochmals aus dem Brustraum gezogen werden. Vorsichtig wurde sie zwischen den beiden Branchen der Pinzette angeschnitten (Abb. 12) und der herausfließende Bluttropfen abgetupft. Der Katheter wurde auf Vorderpfotenlinie abgeschnitten (Abb. 13), etwas angespitzt und vorsichtig mit einer Pinzette in die Arterie bis zum Branch der Klemmpinzette eingeschoben (Abb. 14). Der Katheter

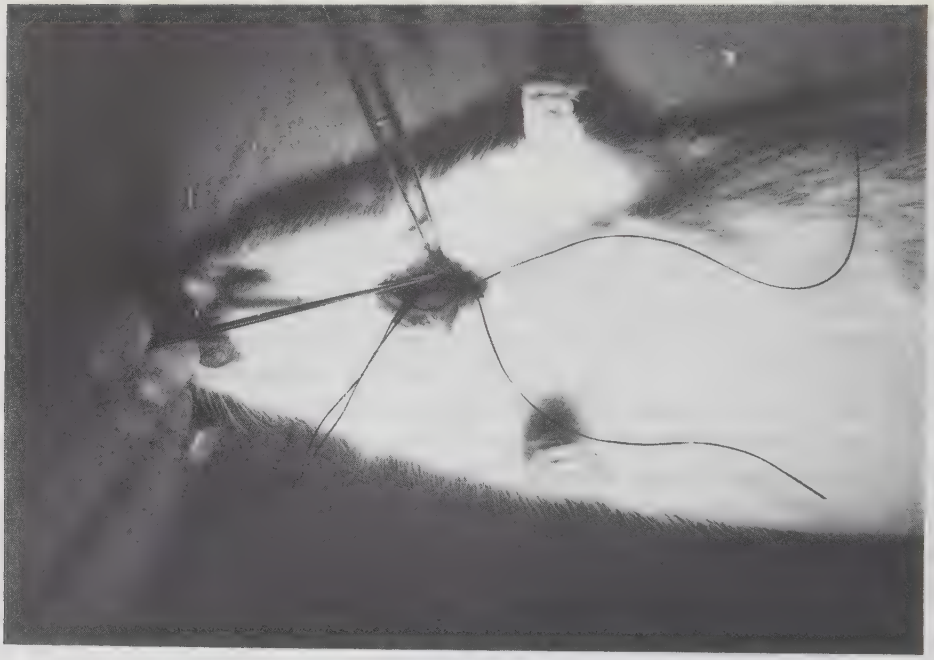


Abbildung 10: Ansetzen des "Perforators"

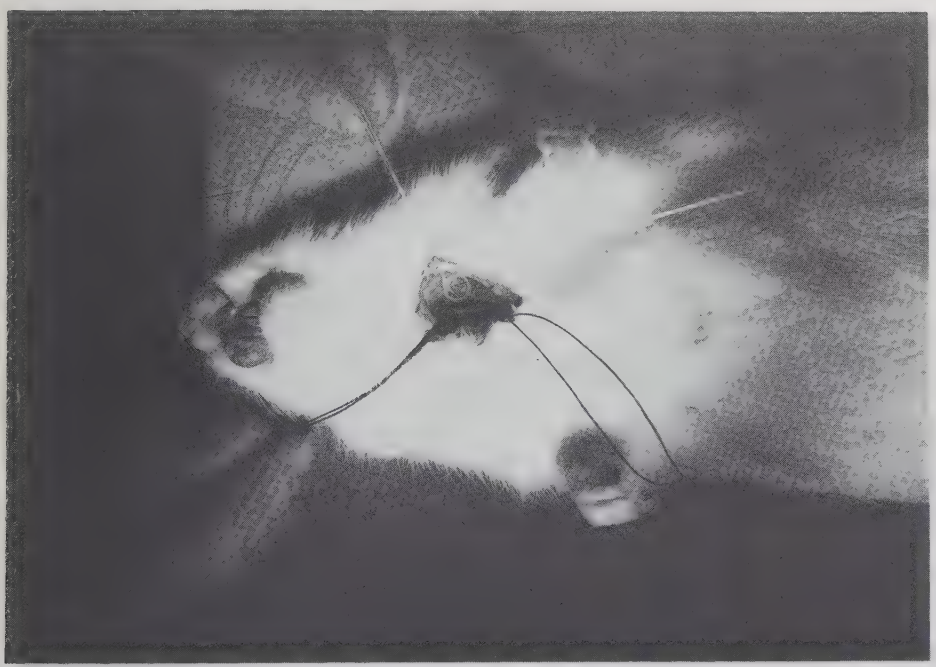


Abbildung 11: Lage der Katheterschleife

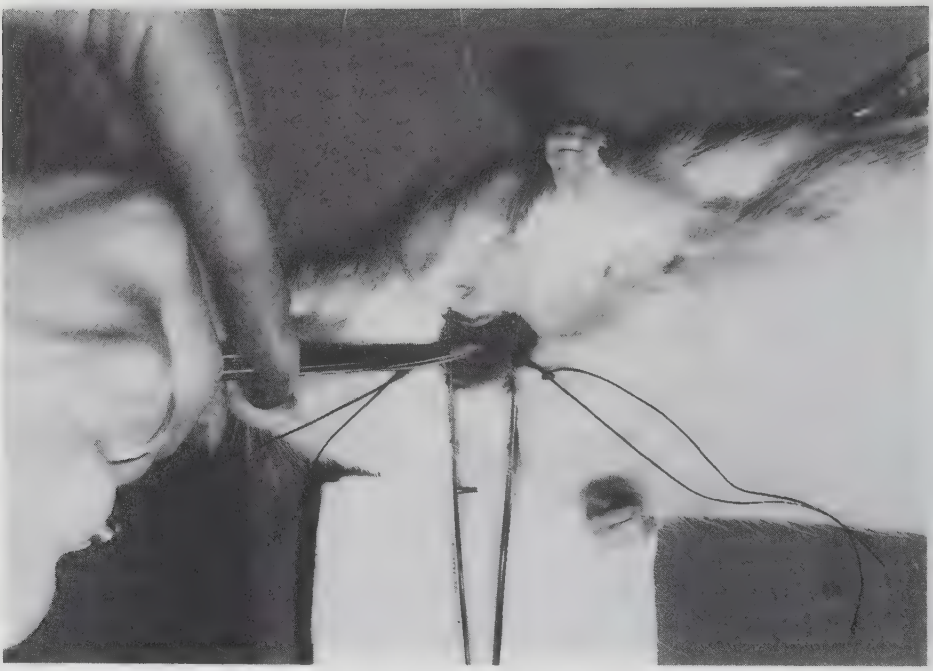


Abbildung 12: Anschneiden der Arterie

Abbildung 13: Länge des Teils des Katheters,
der in die Arterie geschoben wird

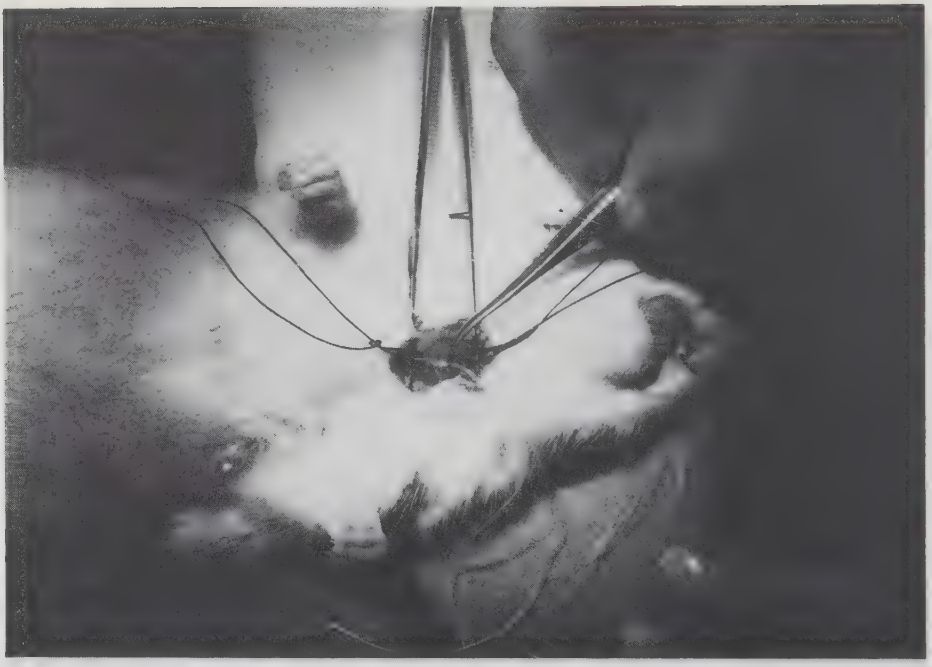


Abbildung 14: Einschieben des Katheters in die Arterie

wurde mit der schon anfangs gezogenen Schleife cranial der Branche fest mit der Arterie fixiert, daraufhin wurde die Klemmpinzette entfernt und der Katheter noch etwas in die Arterie cardialwärts eingeschoben. Sofort wurde aspiriert, um die Durchgängigkeit zu überprüfen. Daraufhin mußte der Katheter mit NaCl leergespült werden, damit das Blut nicht koagulieren und durch einen Pfropf den Katheter nicht verschließen konnte. Schließlich wurde der Katheter fest im Körper angenäht (Abb. 15), der durchtrennte Muskel wieder zugenäht (Abb. 16) und das äußere Gewebe mit HISTACRYL^{R} (B. Braun, Melsungen) verklebt. Damit das Tier das freie Katheterende nicht abbiß, wurde der Katheter nur etwa 4 cm lang belassen und mit einer kleinen rundgeschliffenen Metallspitze verschlossen.
Der Versuchsablauf der Ventrikelkatheterisierung wurde schon in Kapitel 3 beschrieben.

9.3. Ablauf der RR-Kontrolle

Die Blutdruckmessungen wurden einen Tag nach dem Operationseingriff vorgenommen.
Um einen Gegenpol zum Blutdruck der Tiere zu erreichen, mußten die Ratten an eine Gegenstromanlage angeschlossen werden. An einem Perfusor (B. Braun, Melsungen), mit dem unter Hilfe einer 10 ml Spritze von 0,9 % NaCl der erforderliche Gegendruck erzeugt wurde, konnte die Durchfließgeschwindigkeit variabel eingestellt werden. Für die Wistar-Ratten mußte die Stellung 2 gewählt werden, die einem NaCl-Durchfluß von 0,380 ml/h entspricht. Ein Gummischlauch verband die Spritze des Perfusors mit dem Druckaufnehmerkopf. An diesem Druckaufnehmerkopf war ein weiterer Schlauch angeschlossen, der sich mit dem Katheterende verstöpseln ließ. Um dieses Schlauchsystem luftblasenfrei zu halten, waren am Druckaufnehmerkopf zwei 2 ml Spritzen angebracht, mit deren Hilfe man mit NaCl das System spülen konnte. Der Druckaufnehmerkopf war noch mit dem Blutdruckanzeigegerät (Hellige 1a) verbunden, das nach jeder Messung neu auf den Nullpunkt einju-

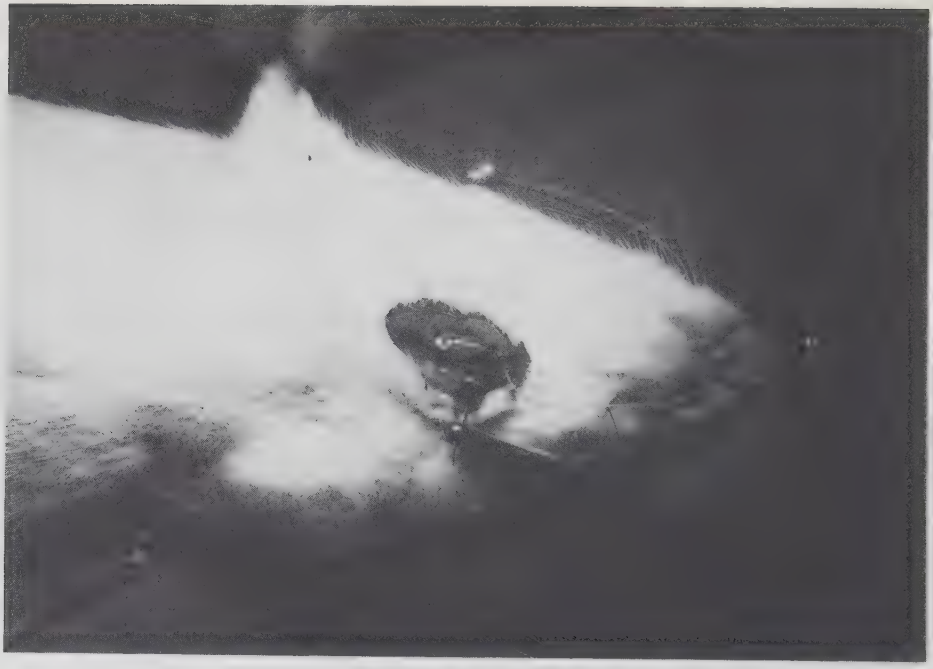


Abbildung 15: Fixieren des Katheters im Körper

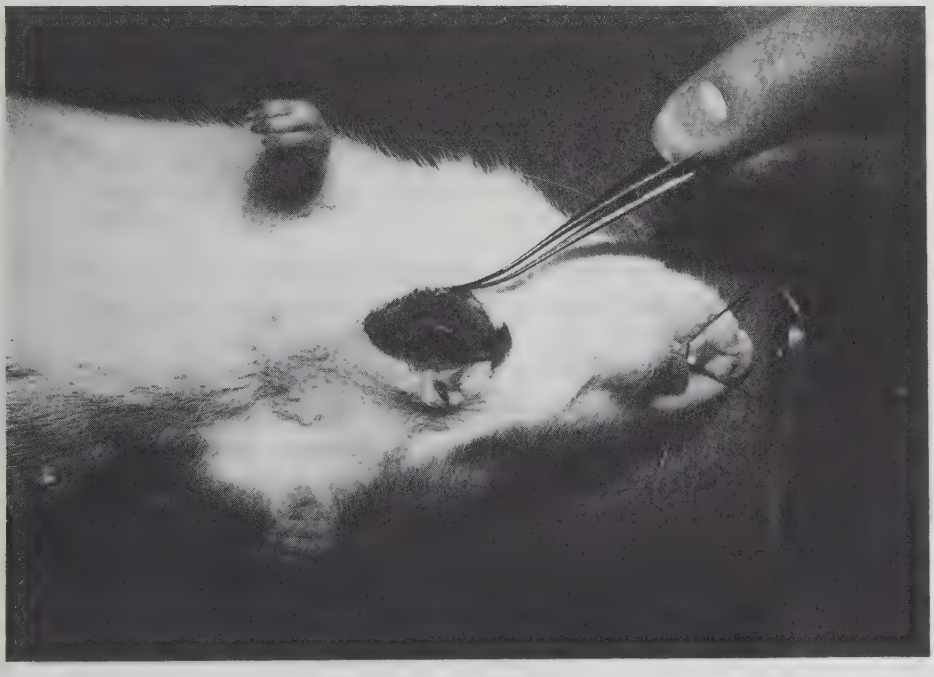


Abbildung 16: Nahtschluß des Musc. sternohyoideus

stiert werden mußte. Für den Versuch wurde der Metallnut unter vorheriger Abklemmung des Katheters herausgezogen, der Katheter an das Schlauchsystem angeschlossen und die Klemme entfernt.

Nachdem sich die Tiere 10 Minuten in dem kleinen Plastikkäfig beruhigen konnten, wurde die Substanz P appliziert. Die Verdünnung erfolgte wie oben beschrieben. Die Dosis wurde bei konstantem Volumen von 5 µg bis 50 µg gewählt. Die Methode der Applikation erfolgte ebenfalls wie schon oben beschrieben.

Der erste Meßwert wurde im Moment der Injektion genommen, die folgenden Messungen erfolgten in Abständen von 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 und 60 Minuten. Eine dauernde Kontrolle sollte vermeiden, daß durch den Blutdruck Blut in das Schlauchsystem gelangen konnte.

Die Tiere wurden nach Ablauf der 60 Minuten durch eine Überdosis Inaktin getötet. Abbildung 17 zeigt die Beziehung zwischen Substanz P - Dosis und den Blutdruckveränderungen.

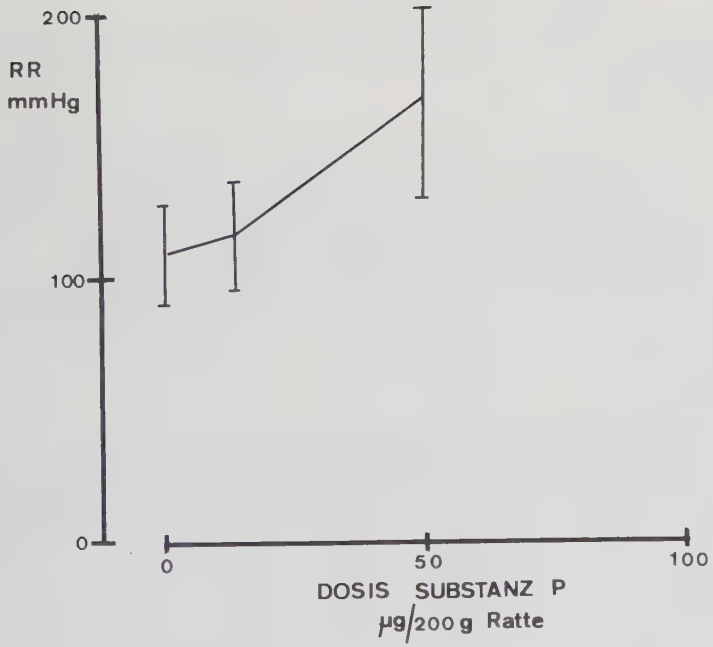


Abbildung 17: Blutdruckkurve
Verhalten nach intraventrikulärer
Substanz P - Applikation

C. ERGEBNISSE

Die cyclo-AMP-Wertänderungen nach intraventrikulärer Gabe von Substanz P in topographisch verschiedenen Gehirnarealen von Ratten sind in Diagramm 1 aufgeführt.

Wie man aus dem Diagramm herauslesen kann, vermag Substanz P die cAMP-Konzentrationen in verschiedenen Gehirnarealen zu beeinflussen.

Auffallende Steigerungen der cAMP-Werte wurden in folgenden Arealen festgestellt: Cortex frontalis, Nucleus amygdaleus centralis, Nucleus interstitialis striae terminalis, Nucleus hypothalamus anterior, Substantia grisea centralis.

Andererseits nahmen die Werte in folgenden Gehirnarealen ab: Globus pallidus, Habenula, Nucleus hypothalamus posterior.

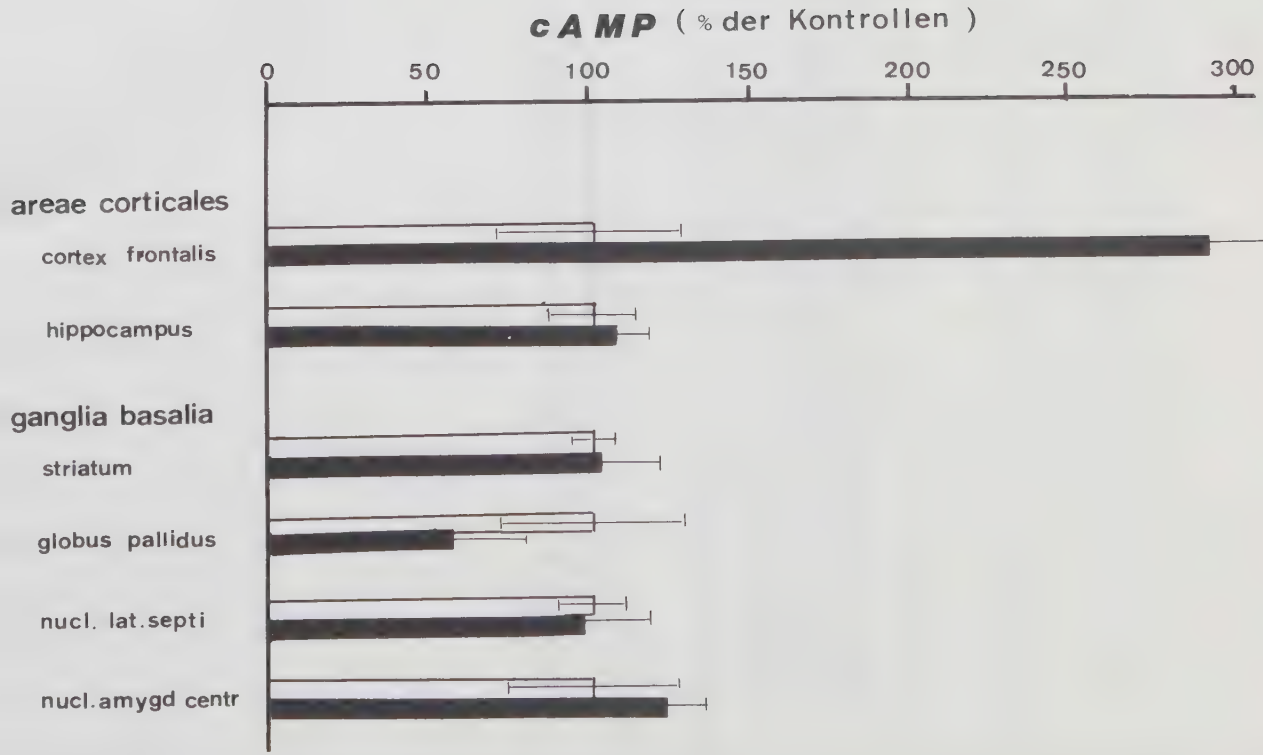
Alle anderen untersuchten Areale zeigten keine auffallenden Veränderungen in ihren cAMP-Werten.

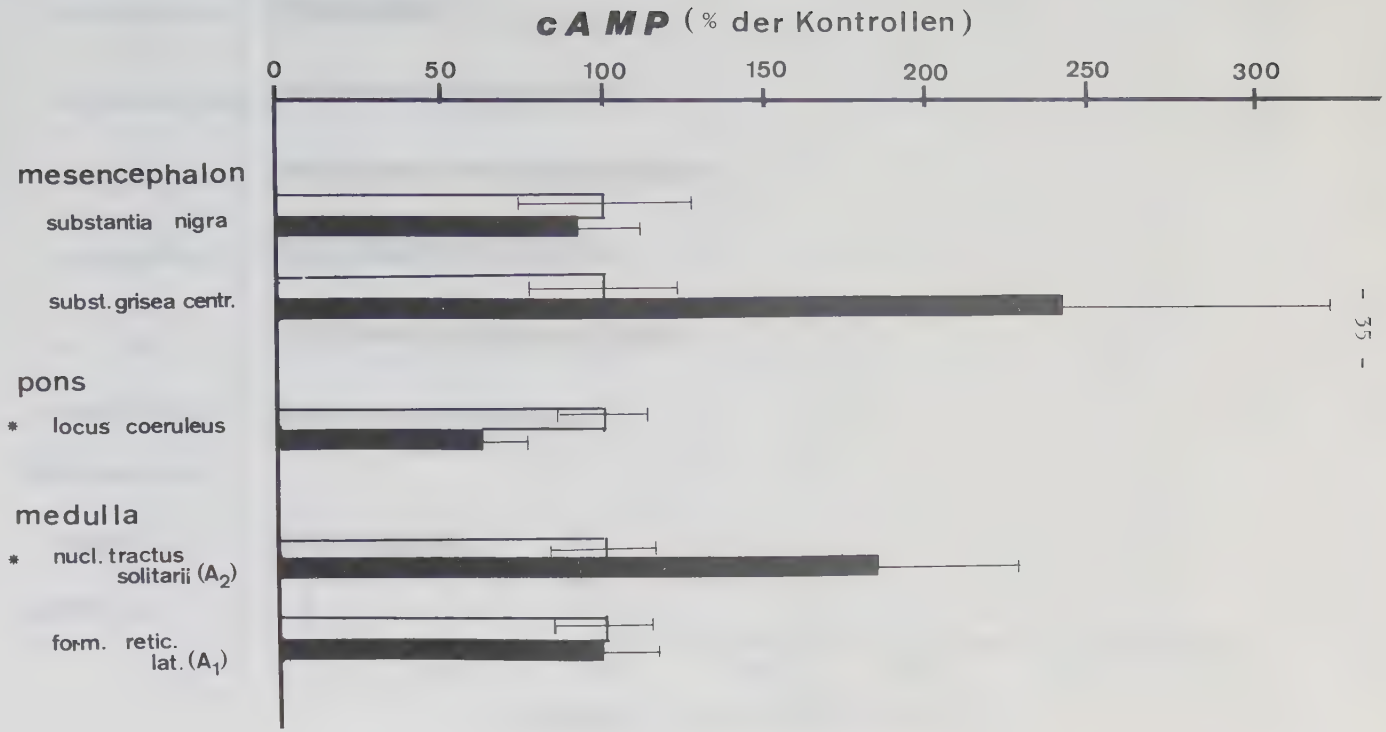
D I A G R A M M 1

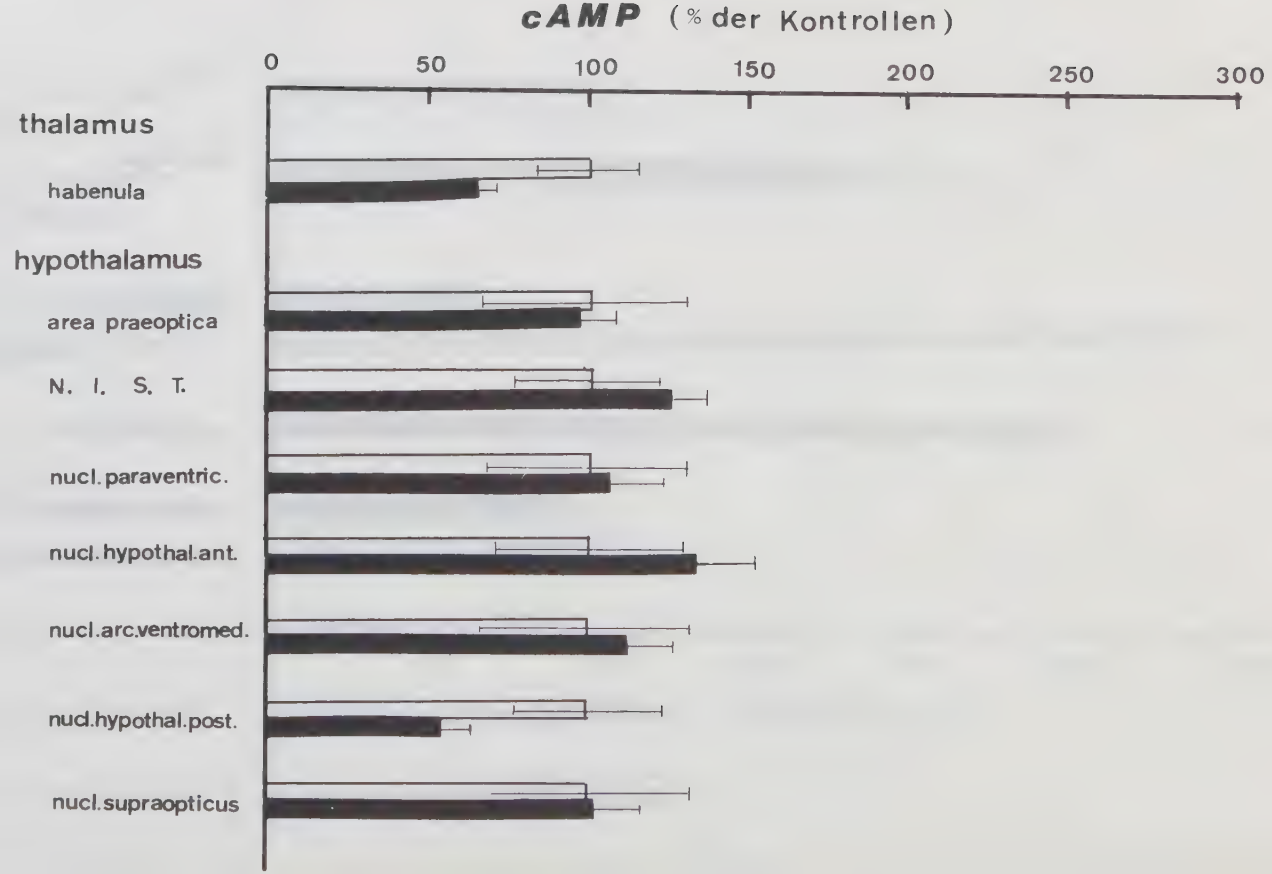
Prozentuale Veränderungen des cAMP-Gehalts definierter Gehirnareale nach zentraler Substanz P - Applikation im Vergleich zu den Kontrollen (weiße Säule = 100 % ± Standardabweichung)

Zahl der Tiere/Areal n = 5 - 8

* Siehe Arbeit von G. Fritz: Zentrale Effekte von Substanz P unter Berücksichtigung cardio-vaskulärer Areale.


cAMP (% der Kontrollen)
0
50
100
150
200
250
300
areae corticales
cortex frontalis
hippocampus
ganglia basalia
striatum
globus pallidus
nucl. lat.septi
nucl.amygd centr


cAMP (% der Kontrollen)
0
50
100
150
200
250
300
mesencephalon
substantia nigra
subst. grisea centr.
pons
* locus coeruleus
medulla
* nucl. tractus solitarii (A_2)
form. retic. lat. (A_1)


cAMP (% der Kontrollen)
0
50
100
150
200
250
300
thalamus
habenula
hypothalamus
area praeoptica
N. I. S. T.
nucl. paraventric.
nucl. hypothal. ant.
nucl. arc. ventromed.
nucl. hypothal. post.
nucl. supraopticus

D. DISKUSSION

Substanz P ist im Gehirn breitfächrig, aber sehr ungleich verteilt. Sie kommt im zentralen Nervensystem in präsynaptischen Strukturen, und hier besonders innerhalb der Vesikel, vor (CUELLO et al. 1977; PICKEL et al. 1977; HÖKFELT et al. 1975). Es scheint daher, daß Substanz P eine Rolle in der Neurotransmission spielen könnte, direkt als Neurotransmitter oder als Modulatorsubstanz.

Substanz P kann aber nicht als ein allgemeiner Aktivator des Adenyl-Cyclase-Systems bezeichnet werden, da Substanz P zum Beispiel keine Auswirkungen auf Enzymaktivitäten von Leberzellen, von Erythrozyten oder von Parotiszellen besitzt (DUFFY et al. 1975; RUDICH, BUTCHER 1976).

Unsere Ergebnisse zeigen, daß für die Substanz P - Wirkung im ZNS cAMP-abhängige Mechanismen eine Rolle spielen. Unsere "in vivo"-Ergebnisse stehen dabei in Einklang mit Untersuchungen von DUFFY und Mitarbeitern (1975), wobei diese Autoren ihre Studien nur an sehr großen Hirnarealen und "in vitro" durchgeführt haben. Auch ihre Untersuchungen zeigten, daß Substanz P - nach Homogenisation sowohl des gesamten Gehirns als auch nach Homogenisation von 13 Teilregionen des menschlichen Gehirns - die Adenylat-Cyclase-Aktivität anregt.

Nach Applikation von Substanz P in den lateralen Gehirnventrikel von wachen Ratten wurden nur in einigen Gehirnstrukturen cAMP-Konzentrationsänderungen festgestellt; in verschiedenen anderen Gehirnarealen fanden sich hingegen keine Konzentrationsänderungen. Diese unterschiedliche Stimulierbarkeit der Adenylcyclase durch Substanz P dürfte ihre Ursache nicht in einer unterschiedlichen Diffusionsstrecke für Substanz P im Liquorsystem haben, da

z.T. ventrikelferne Areale cAMP-Konzentrationsveränderungen zeigten, und umgekehrt ventrikelnahe gelegene Areale z.T. nicht. Die Areale waren vom Liquorsystem unterschiedlich weit entfernt, damit keine durch den Versuchsaufbau bedingten Veränderungen des cAMP-Systems in Erscheinung treten konnten und die Diffusionsstrecke sich ebenfalls nicht entscheidend auswirken konnte.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß zentrale Aufgaben von Substanz P oder zumindest Teile davon mit cAMP-abhängigen Mechanismen in Verbindung stehen. Die Tatsache, daß nach zentraler Applikation von Substanz P nur einige der ausgewählten Gehirnareale mit cAMP-Konzentrationsänderungen reagieren, spricht für Substanz P-spezifische Funktionen in diesen Gehirnstrukturen.

Aufgrund unserer Untersuchungen kann man nicht erkennen, ob die gemessenen cAMP-Konzentrationsänderungen in den ausgewählten Gehirnarealen auf direkter Einwirkung von Substanz P auf spezifische Rezeptorzellen beruhen oder auf indirekte, möglicherweise modulierende Wirkung über zentrale Synapsenaktivität. Substanz P bewirkt eine cAMP-Konzentrationsveränderung, die in den verschiedenen Arealen nicht gleichsinnig ist, sondern erniedrigte und erhöhte Werte bringt. Würde Substanz P direkt in den Arealen auf das Adenyl-Cyclase-System wirken, würde eine einheitliche Antwort erwartet werden. Die Ergebnisse lassen daher die Vermutung aufkommen, daß zumindest teils auch indirekte Wirkungen von Substanz P - vielleicht als Neuromodulator - eine Rolle spielen könnten. Die indirekte Wirkung, die den cAMP-Stoffwechsel im Gehirn beeinflußt, könnte dabei auf einer Aufnahme von Norepinephrin in Synaptosome (PIESCHE et al. 1976), auf einer Umsatzänderung des Norepinephrin-, Dopamin- oder 5 OH-Tryptaminumsatzes (MAGNUSSEN et al. 1976; KELLY, IVERSEN 1978) oder auf einer Wechselwirkung von Acetylcholin mit Nikotinrezeptoren (RYALL, BELCHER 1977) bestehen. Wenn man aber die

Resultate von DUFFY und seinen Mitarbeitern berücksichtigt, scheint es möglich, daß die hier auftretenden Veränderungen der cAMP-Werte direkten Einwirkungen von Substanz P auf das Adenyl-Cyclase-System in einigen von diesen untersuchten Gehirnarealen zugeschrieben werden können.

Einen Anstieg der cAMP-Werte nach zentraler Applikation gab es in Cortexarealen (Cortex frontalis), in den Basalganglien (Nucleus amygdaloideus centralis), im Hypothalamus (Nucleus hypothalamus anterior, Nucleus interstitialis striae terminalis) und im Mittelhirn (Substantia grisea).

Eine Verringerung der cAMP-Werte wurde in den Basalganglien (Globus pallidus), im Thalamus (Habenula) und im Hypothalamus (Nucleus hypothalamus posterior) gemessen. Andere Hirngebiete wie Hippocampus, Corpus striatum (Nucleus caudatus/ Putamen), Nuclei septales laterales, Regio praeoptica, Nucleus paraventrikularis, Nuclei arcuati ventromediales, Nucleus supraopticus, Substantia nigra oder Formatio reticularis lateralis zeigten keine signifikanten Änderungen der cAMP-Werte.

Diese Verteilung der cAMP-Wertänderungen nach intraventrikulärer Substanz P-Applikation stimmt nur zum Teil mit der endogenen Substanz P-Verteilung im Rattengehirn überein. Der Grund für das abweichende Verhalten der Substanz P-Verteilung und der cAMP-Konzentrationsveränderung, die von Substanz P ausgelöst wird, könnte darin liegen, daß Substanz P-Speicherung und Substanz P-"Rezeptor"-Verteilung nicht identisch sind, oder daß in Arealen mit hoher Substanz P-Konzentration ein relativ geringer Zuwachs und in Arealen mit geringer Substanz P-Konzentration ein relativ hoher Substanz P-Zuwachs besteht. Hohe Substanz P-Konzentrationen werden im Mesencephalon, im Hypothalamus, in der Regio praeoptica gefunden. In den Nuclei septales,

Nucleus interstitialis striae terminalis, Nuclei amygdales und innerhalb des Limbischen Systems im Tuberculum olfactorium und in der Habenula sowie im Telencephalon ist das Vorkommen von Substanz P ebenfalls bedeutend.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Substanz P ist ein mannigfach wirkendes Undecapeptid, das im zentralen Nervensystem anscheinend als Neurotransmitter fungiert. Die physiologische Rolle von Substanz P im zentralen Nervensystem ist noch sehr unklar.

Im ZNS spielen bei der Substanz P-Wirkung cAMP-Mechanismen eine wichtige Rolle, daraus konnte über die Messung von Adenylat-Cyclase-Aktivitätsänderungen eine topographische Bewertung der Substanz P-Wirkung dargestellt werden.

Bei diesen "in vivo" Versuchen kam es zu Alterationen, die nicht generell ausfielen. In einigen Arealen - Cortex frontalis, Nucleus amygdaloideus centralis, Nucleus hypothalamus anterior, Nucleus interstitialis striae terminalis - kam es zu erhöhten cAMP-Werten, in anderen - Globus pallidus, Habenula, Nucleus hypothalamus posterior - zu verringerten Werten, alle übrigen untersuchten Areale zeigten keine auffallenden Wertveränderungen.

Aus den Versuchen konnte nicht herausgelesen werden, ob eine direkte oder indirekte Wirkung von Substanz P auf das Adenylat-Cyclase-System vorliegt; es muß sich aber um eine Substanz P-spezifische Wirkung handeln.

Über die Veränderungen der cAMP-Werte dieser Areale könnten weitere Untersuchungen vielleicht Hinweise über die genaue zentrale Funktion und Wirkung von Substanz P geben.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Priv.Doz. Dr.med. G. Schmid für die Überlassung des Themas und für seine Unterstützung danken.

Besonders danke ich Herrn Professor Dr. A. Heidland für sein stetiges Interesse und die Unterstützung während der Durchführung der Arbeit und Herrn Professor Dr.Dr. K. Hempel (Institut für Medizinische Strahlenkunde) für die Arbeitsmöglichkeit an seinem Institut.

Auch möchte ich mich bei der Firma Schering (Berlin) für die Möglichkeit der Benutzung ihres Mikrowellenherdes bedanken.

Nicht zuletzt danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors der Abteilung.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1 ALBANO J.; MAUDSLEY D.V.; BROWN G.D.: A simplified procedure for the determination of adenyl cyclase activity
Biochem. soc. trans. 477-479 (1973)

2 BELCHER G.; RYALL R.W.: Substance P and renshawcells. A new concept of inhibitory synaptic interactions
J. physiol. 272 105-119 (1977)

3 BROWN J.H.; MAKMAN M.H.: Stimulation by dopamine of adenyl cyclase in retinal homogenates and of cAMP-formation in intact retina
Proc. Nat. Acad. Science 69 539-543 (1972)

4 CHANG M.; LEEMAN S.: Isolation of a sialogogic peptide from bovine hypothalamic tissue and its characterization as substance P
J. biol. chem. 245 2784-4790 (1970)

5 CHANG M.; LEEMAN S.; NIALL H.: Amino acid sequence of SP
Nature New biol. 232 86-87 (1971)

6 CUELLO A.C.; EMSON P.S.; PAXINOS G.; JESSEL T.: SP-containing and cholinergic projections from the habenula
Brain Research 149 413-429 (1977)

7 DRUMOND G.J., MA Y.: Metabolism and function of cAMP in nerve
Progress in Neurobiology 2 119-176 (1973)

8 DUFFY M.J.; POWELL D.: Stimulation of brain adenyl-cyclase activity by the undecapeptid SP and its modulation by calcium ion
Biochem. Biophys. Acta 385 275-280 (1975)

9 DUFFY M.J.; WONG J.; POWELL D.: Stimulation of adenylat cyclase activity in different areas of human brain by SP
Neuropharmalogy 14 615-618 (1975)

10 VON EULER U.S.; GADDUM J.: An unidentified depressor in certain tissue extracts
J. physiol. London 72 74-87 (1931)

11 VON EULER U.S.: Preparation of Substance P
Scand. Arch. Physiol. 73 142-144 (1936)

12 GADDUM J., SCHILD H.: Depressor substances in extracts of intestine
J. physiol. London 83 1-14 (1934)

13 GLOWINSKI J.; IVERSEN L.L.: Regional studies of catecholamines in the rat brain. The disposition of ^{3}H-norepinephrin, ^{3}H-dopamine and ^{3}H-dopa in various regions of the brain.
J. Neurochem. 13 655-669 (1966)

14 GREENGARD P.: Cyclic nucleotides protein phosphorylization and neuronal function
Advan. Cyclic Nucleotide Research 5 585-602 (1975)

15 HENRY J.L.: Effects of SP on functionally identified units in cat spinal cord
Brain Research 114 439-452 (1976)

16 HOKFELT T., KELLERTH J.O.; NILSSON G.; PERNOW B.: SP, localization in the central nervous system
Science 190 889-890 (1975)

17 KATAOKA K.: The subcellular distribution of SP in the nervous system
Jap. J. physiol. 12 81-96 (1962)

18 KEBABIAN J.W.; GREENGARD P.: Dopamine sensitive adenyl cyclase possible role in synaptic transmission
Science 174 1346-1349 (1971)

19 KEBABIAN J.W.; PETZOLD G.L.; GREENGARD P.: Dopamine sensitive adenyl cyclase in caudate nucleus of rat-brain and its similarities to the dopamine receptors
Proc. Nat. Acad. Sci. 69 2145-2150 (1972)

20 KELLY A.E.; IVERSEN S.D.: Behavioural response to bilateral injection of SP into the substantia nigra of the rat
Brain Research 158 474-478 (1978)

21 LEEMAN S.E.; MROZ E.A.: Minireview SP
Life science 15 2033-2044 (1974)

22 LEEMAN S.E., HAMMERSCHLAG R.: Stimulation of salivary secretion by a factor extracted from hypothalamic tissue
J. endocrinology 81 803-810 (1967)

23 LEMBECK F.; STARKE: Behandlung von SP-Präparaten mit Aluminiumoxid
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharm. 259 307-313 (1968)

24 LEMBECK F.; ZETLER G.: SP: a polypeptide of possible significance exspecially within the nervous system
Int. Rev. Neurobiol. 4 159-215 (1962)

25 LOWRY O.H.; ROSENBROUGH N.J.; FARR A.L.; RANDALL R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent
J. biol. Chem. 193 265-275 (1951)

26 MAGNUSSON T.; CARLSSON A.; FISHER G.H.: Effect of synthetic SP on monoaminergic mechanisms in brain
J. Neural. Transm. 38 (2) 89-93 (1976)

27 MILLS J.; MACFARLANE N.; WARD P.: Increase in kallikrein excretion during the natriuresis produced by arterial infusion of SP
Nature 247 108-109 (1974)

28 NATHANSON J.A.: Cyclic nucleotides and nervous system
Physiological Review 57 157-256 (1977)

29 OTSUKA M.; KONISHI S.: SP and excitatory transmitter of primary sensory neurons
Cold Spring Harbour Symp. quant. Biol. 40 135-143 (1976)

30 OTSUKA M.; KONISHI S.; TAKAHASHI T.: The presence of a motoneuron-depolarising peptide in bovine dorsal roots of spinal nervs
Proc. jap. acad. 48 747-752 (1972)

31 PALKOWITZ M.: Isolated removel of hypothalamic or other brain nuclei of the rat
Brain Research 59 449-450 (1973)

32 PERNOW B.: Studies of SP.purification and biological actions
Acta physiol. scand. 29 Suppl. 105 1-90 (1953)

33 PICKEL V.M.; REIS D.J.; LEEMAN S.E.: Ultrastructural localization of SP in neurons of spinal cord
Brain Research 122 (3) 534-540 (1977)

34 PIESCHE J.; HILSE H.; SCHEER E.; BIENERT M.; OEHME P.: Über die Hemmung der ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahme in Synaptosomen durch SP
Acta biol. med. ger. 36 1351-1354 (1976)

35 RANDIC M.; MILETIĆ V.: Effect of SP in cat dorsal column neurons activated by noxious stimuli
Brain Research 128 164-169 (1977)

36 ROBISON G.A.; BUTCHER R.W.; SUTHERLAND E.W.: Cyclic AMP
New Y. academic (1977)

37 RUDICH L.; BUTCHER F.R.: Effect of SP and eledoisin on K^+efflux amylase release and cyclic nucleotide levels in slices of rat parotid gland
Biochem. Biophys. Acta 444 704-711 (1976)

38 RYALL R.W.: The subcellular distributions of Ach, SP, 5-hydroxytryptamine, γ-aminobutyricacid and glutamica-cid in brain homogenates
J. neurochem. 11 131-145 (1964)

39 RYALL R.W.; BELCHER G.: Substance P selectively blocks nicotinic receptors on Renshaw cells: a possible synaptic inhibitory mechanism
Brain Research 137 (2) 376-380 (1977)

40 SCHMIDT H.J.; SCHMIDT D.E.; ROBISON G.A.: Concentrations of cyclic AMP in various areas of brain after decapitation
Science 173 1142-1143 (1971)

41 SCHWARZ-MANN (Div. of Becton Dickinson and Co) Heidelberg
Arbeitsanleitung zum cAMP-RIA-Kit

42 STERN P.; CATOVIC S.; STERN M.: Mechanism of action of SP
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharm. 281 233-239 (1974)

43 STERN P.: The influence of synthetic SP on tremor caused by LSD in mice
J. pharm. pharmac. 25 259-261 (1973)

44 STUDER R.O.; TRZECIAK A.; LERGIER W.: Isolierung und Amino-säuresequenz von Substanz P aus Pferdedarm
Helv. Chim. Acta 56 860-866 (1973)

45 SUTHERLAND E.W.; RALL T.W.: Fractination and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles
J. Biol. Chem. 232 1077-1091 (1958)

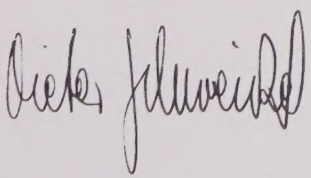
46 TREGEAR G.; NIALL H.; POTTS J.; LEEMAN S.; CHANG M.: Synthesis of SP
Nature 232 New biol. 87-89 (1971)

NACHTRAG:

SCHMID G.: Habilitationsschrift Würzburg (1979)

L E B E N S L A U F

30.11.1951	Geboren in Forchheim/Ofr. als drittes von drei Kindern des Physikers Dr. Hans Schweickert und seiner Ehefrau Elise-Charlotte, geborene Dieterich
1958 - 1962	Besuch der Loschgeschule in Erlangen
1962 - 1971	Besuch des Marie-Therese-Gymnasiums in Erlangen
Juni 1971	Abitur in Erlangen
01.10.1972 - 31.12.1973	Ableistung des Grundwehrdienstes
WS 1975	Beginn mit dem Studium der Zahnmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
WS 1981	Staatsexamen
09.02.1981	Erteilung der Approbation als Zahnarzt



Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80